

СКАНИРУЮЩАЯ ЗОНДОВАЯ МИКРОСКОПИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ТОНКИХ ОРГАНИЧЕСКИХ ПЛЕНОК

Галлямов Марат Олегович

June 1999

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В последние годы методы сканирующей зондовой микроскопии позволили достичь уникальных научных результатов в различных областях физики, химии и биологии. Новые экспериментальные возможности данного направления — неразрушающий характер исследований, высокое пространственное разрешение и возможность проведения экспериментов в жидких средах — делают особенно перспективным применение СЗМ¹ (в частности, атомно-силовой микроскопии) для изучения структуры и свойств *биологических и органических* материалов. В то же время СЗМ-исследование этих объектов остается более сложной задачей в сравнении с аналогичными исследованиями поверхностей твердых (кристаллических) тел. Действительно, прошло более десяти лет с момента возникновения зондовой микроскопии (в 1981 г.), прежде чем в 1992 г. была убедительно продемонстрирована адекватность этого метода для исследований биополимеров на примере АСМ²-визуализации молекулы ДНК³. За эти годы возникло понимание, что *определяющей задачей* успешности подобных исследований, требующей экспериментального решения в каждом конкретном случае, является *иммобилизация* биологических и органиче-

¹СЗМ — сканирующая зондовая микроскопия

²АСМ — атомно-силовая микроскопия

³ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

ских структур на поверхностях твердых подложек в таком состоянии, чтобы было возможным исследовать их структурные особенности.

Весьма важным для адекватного применения СЗМ в широкомасштабных научных исследованиях является отслеживание и систематизация возможных механизмов возникновения *артефактов*, т.е. аппаратных эффектов, приводящих к наблюдению ложных или искаженных свойств исследуемого объекта.

Цель и задачи работы. Целью диссертации являлась разработка методов СЗМ-исследования нуклеиновых кислот и их комплексов, что и определило основные задачи:

- разработка алгоритмов определения реальной геометрии объекта из анализа экспериментально измеренных параметров его АСМ-изображения (учет артефактов);
- определение адекватных методик иммобилизации молекул нуклеиновых кислот и их комплексов с белками и поверхностно-активными веществами в различных экспериментальных условиях;
- отработка методов контролируемой модификации свойств подложки нанесением тонких органических пленок; исследование влияния природы подложки и процедуры формирования пленок на структуру покрытия.

Материалы и методы. АСМ-исследования проводили в режимах постоянного или прерывистого⁴ контактов на приборе «Nanoscope-IIIa» (Digital Instruments, США) с использованием коммерческих Si или Si₃N₄ *кантилверов* (Nanoprobe, Digital Instruments, США). Эксперименты в жидких средах проводили с использованием жидкостной ячейки (Digital Instruments, США). В качестве подложек использовали слюду (мусковит) или высокоориентированный пиролитический графит (пирографит): как поверхности свежего скола, так и модифицированные обработкой катионными ПАВ⁵, катионами металлов, аминопропилтриэтоксисиланом или нанесением тонкопленочного органического покрытия. Обработку и построение АСМ-изображений проводили при помощи программного обеспечения «Nanoscope-IIIa» (Digital Instruments, США) и «Фемтоскан-001» (Центр перспективных технологий, Россия).

⁴TappingMode™

⁵ПАВ — поверхностно-активные вещества

При приготовлении всех препаратов использовали бидистиллированную деионизованную воду, контроль чистоты воды проводили методом АСМ. При исследованиях нуклеиновых кислот и их комплексов на воздухе каплю препарата наносили на поверхность подложки, экспонировали, промывали и высушивали в естественной атмосфере. При исследовании в жидких средах препарат вводили в жидкостную ячейку прибора и исследовали структуры, адсорбировавшиеся из раствора на поверхность подложки.

При приготовлении пленок Ленгмюра-Блоджетт использовали автоматизированную ЛБ⁶ ванну, при этом формировали тонкопленочные покрытия как вертикальным методом ЛБ, так и методом горизонтального осаждения; давление выделения π поддерживали на уровне 20–40 мН/м. При АСМ-анализе параметров молекулярной упаковки тонких пленок специальное внимание уделили исключению искажающего влияния температурного дрейфа.

Научная новизна и практическая ценность работы. Разработаны количественные методики описания двух искажающих эффектов АСМ: *уширения* и *занижения профиля* изображений отдельных микрообъектов, адсорбированных на поверхность твердой подложки. Предложен простой в реализации алгоритм численного решения, позволяющий восстановить их истинные размеры. Проанализирован механизм достижения «атомного» разрешения в АСМ в свете результатов теории контактных деформаций. На основе соотношений Герца этой теории разработана методика определения модуля упругости микрообъектов, иммобилизованных на подложке, с использованием АСМ.

Апробирована методика приготовления образцов для АСМ-исследования молекул одонитовой РНК⁷ и их взаимодействия с белками. Применение данной методики позволило впервые методом АСМ визуализировать стадии процесса высвобождения молекулы РНК из белковой оболочки частиц ВТМ⁸. При этом, в отличие от исследований электронной микроскопии, методика *не включает* процесс какого-либо дополнительного контрастирования молекул РНК (комплексобразования с белковой пленкой, запыления и т.п.). Проведение подобных АСМ-исследований в условиях близких нативным может дать вклад в понимание механизмов процесса размножения вирусов.

⁶ЛБ — Ленгмюра-Блоджетт

⁷РНК — рибонуклеиновая кислота

⁸ВТМ — вирус табачной мозаики

Динамика процессов компактизации/декомпактизации молекул высокомолекулярной ДНК Т4 впервые исследована методом АСМ непосредственно в водно-спиртовой смеси (при контролируемом изменении концентрации изопропанола). В сравнении с результатами флуоресцентной микроскопии удалось достичь существенно более высокого пространственного разрешения, что позволило визуализировать тороидальные образования, сформированные отдельными витками частично компактизованных молекул. По результатам наблюдений и анализа геометрии компактной глобулы предложена модель компактизации ДНК. Разработанный подход может позволить исследовать системы, моделирующие транспорт генетического материала внутрь живых клеток.

В экспериментах по АСМ-визуализации структуры пленок ЛБ показано преимущество метода горизонтального осаждения монослоев на подложку. С помощью АСМ анализировали влияние подложки на молекулярную упаковку тонких пленок. Проведение подобных исследований может позволить прояснить основные механизмы, определяющие формирование структуры пленки.

По разработкам диссертации поставлена задача спец. практикума кафедры физики полимеров и кристаллов физического факультета МГУ «Сканирующая зондовая микроскопия нуклеиновых кислот».

Апробация работы. Основные результаты диссертации были доложены: *на международных конференциях:* 1-й и 2-й по химии высокоорганизованных веществ и научным основам нанотехнологии (Санкт-Петербург, июнь 1996 и 1998 гг.), 4-й и 5-й («NANO-4» и «-5») по наноразмерной науке и технологии (Пекин, Китай, сентябрь 1996 и Бирмингем, Великобритания, август 1998), «Фундаментальные проблемы науки о полимерах (к 90-летию академика В. А. Каргина)» (Москва, Россия, январь 1997), «Nanomeeting-97» и «-99» (Минск, Беларусь, май 1997 и 1999), 9-й по сканирующей туннельной микроскопии, спектроскопии и близким технологиям (Гамбург, Германия, июль 1997), пользователей NanoScore 1997 года (Санта-Барбара, США, август 1997); *на международных симпозиумах:* 7-м ежегодном «Фотоиндуцированный зарядовый перенос: реакции в живой материи» (Рочестер, США, июнь 1996), по коллоидной науке и науке о полимерах «Формирование и динамика самоорганизованных структур в растворах полимеров и поверхностно-активных веществ — последние достижения» (Нагойя, Япония, октябрь 1996), 43-м национальном американского вакуумного общества «Программа наноразмерной науки и технологии» (Филадельфия, США,

октябрь 1996); на XVI Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Санкт-Петербург, Россия, май 1998), на всероссийских рабочих совещаниях «Зондовая микроскопия-97», «-98» и «-99» (Нижний Новгород, Россия, март 1997, 1998 и 1999 гг.); на 2-м и 3-м Белорусских семинарах по СЗМ (Минск, Беларусь, май 1997 и Гродно, Беларусь, октябрь 1998), на Школе по химии и физике полимеров (Тверь, Россия, декабрь 1998).

По результатам работы опубликовано 6 статей и 20 тезисов и рефератов докладов, сделанных на конференциях. В список литературы, представленный в автореферате, вошли статьи по теме диссертации, а также рефераты докладов, материалы которых не нашли полного отражения в опубликованных статьях.

Личный вклад автора. Все экспериментальные измерения зондовой микроскопии, разработка и применение теоретических моделей для интерпретации и анализа экспериментальных данных выполнены автором лично. Автор принимал участие в совместной работе с научными группами Химического факультета МГУ по приготовлению образцов для исследований.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, общего обзора литературы, теоретической и экспериментальной части, выводов, библиографии (132 наименования) и приложения. Теоретическая часть состоит из одной, а экспериментальная из трех глав; каждая глава содержит краткий литературный обзор по конкретной теме исследования. Работа изложена на 227 стр. (с приложением), содержит 54 рисунка и 9 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 Основные принципы СЗМ

В первой главе дан аналитический обзор основных методов и способов измерений зондовой микроскопии, ее возможностей и ограничений. Проанализировано место СЗМ в ряду других физических методов исследования *поверхности*, рассмотрены общие подходы к препарированию образцов нуклеиновых кислот для СЗМ-исследований.

2 Анализ искажающих эффектов АСМ

Результатом работы АСМ является АСМ-изображение: профиль перемещения зонда в процессе *сканирования* при фиксации системой обратной связи постоянного силового взаимодействия зонда и образца. АСМ-изображения могут неадекватно отображать реальную топографию исследуемой поверхности (говорят о наблюдении *артефактов*). В работе предложены количественные описания двух основных артефактов АСМ, проявляющихся при исследовании объектов, адсорбированных на поверхность твердой подложки — *эффектов уширения профиля* и *занижения высот* их АСМ-изображений.

Контактные деформации зонда и образца

При сканировании зонд воздействует на образец с силой в *единицы-десятки наноньютонов*, что, в связи с малым радиусом кривизны кончика зонда (около 10 нм), приводит к значительному *контактному* давлению⁹, которое должно вызывать контактные деформации исследуемого объекта и приводить к занижению высоты его АСМ-изображения. Величина деформации контактирующих тел определяется известными соотношениями *контактной задачи Герца*¹⁰, которые показывают, что формой области контакта двух тел, сдавливаемых силой F , является эллипс с полуосями a и b , причем величина сближения деформируемых тел h может быть выражена через F , a , b , упругий параметр области контакта D ¹¹, а также главные значения суммарного тензора кривизны контактирующих поверхностей — A и B , которые определяются геометрией контакта¹².

Контакт сферического зонда и цилиндрического образца.

Модель цилиндрического образца находит применение при анализе деформаций микрочастиц цилиндрической формы (вирусных частиц, линейных макромолекул и пр.). Однако в этом случае¹³ соотношения Герца, включающие систему нелинейных уравнений с неявными зависимостями от искомым

⁹по нашим оценкам: до 1 ГПа и более

¹⁰см., например, Л. Д. Ландау, Е. М. Лифшиц. *Теория упругости*. — М.: Наука, 1987

¹¹ $D = 3/4 [(1 - \sigma^2)/E + (1 - \sigma'^2)/E']$, здесь E , E' , σ и σ' — модули Юнга и Пуассона материалов зонда и образца

¹²для контакта сферы радиуса R и боковой поверхности цилиндра радиуса R они выражаются: $A = 1/2 (1/R + 1/R)$, $B = 1/2R$

¹³в отличие от известного случая *сферической* геометрии контактирующих тел

параметров, напрямую не упрощаются. Поэтому реализовали общее численное решение, сведя исходные соотношения к независимым уравнениям относительно *одного* неизвестного.

Для двух частных случаев удалось получить *аналитические* формулы, выражающие искомые параметры явно:

а) Если $R < R$, то главные значения суммарного тензора кривизны различаются: $A > B$. Тогда $a < b$ и, если, $a^2 \ll b^2$, то можно показать, что:

$$h \simeq \left(\frac{4}{\pi^2 C} \right)^{1/3} (+1) \times (FD)^{2/3} \times B^{1/3}, \quad (1)$$

где безразмерный параметр C (зависящий от a/b) для многих задач лежит в диапазоне от 1 до 3, и с достаточной точностью можно воспользоваться оценкой.

б) Если $R \gg R$, то $A \sim B$, тогда $a \sim b$ и можно показать:

$$h \simeq (FD)^{2/3} \times \left(\frac{1}{4A} + \frac{1}{4B} \right)^{-1/3}, \quad (2)$$

что имеет структуру, сходную с (1). В обоих случаях оказалось возможным получить формулы и для параметров эллиптической области контакта a и b , что позволяет определить контактное давление.

Результаты расчетов предсказывают тем большую величину относительных деформаций объектов, чем меньше их радиус кривизны, что подтверждается экспериментом. С целью экспериментальной проверки закона $h \sim F^{2/3}$ (см. (1), (2)) мы провели исследования зависимости деформации частиц ВТМ¹⁴ от силы воздействия зонда и обнаружили хорошее совпадение эксперимента с результатами, рассчитанными по разработанному подходу, см. рис. 1. Анализ экспериментальной зависимости позволил определить модуль упругости отдельной вирусной частицы ($E \sim 3 \div 4$ ГПа).

Обоснование возможности достижения атомного разрешения в АСМ.

Результаты применения теории контактных деформаций для контакта зонда с радиусом кривизны кончика R и плоского образца показывают, что при типичных условиях АСМ-эксперимента на воздухе радиус области контакта зонда и образца¹⁵ оказывается ~ 1 нм и *превышает* межатомное расстояние. Это означает, что при сканировании в каждый момент времени

¹⁴ частицы вируса табачной мозаики имеют цилиндрическую форму

¹⁵ $a = (FDR)^{1/3}$

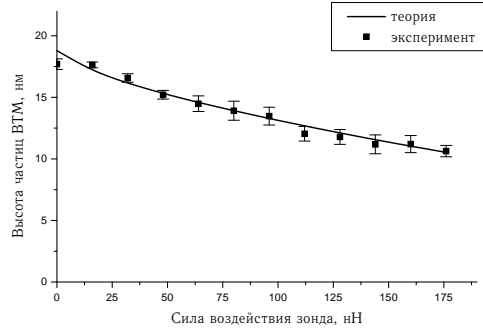


Рис. 1: Экспериментальная и рассчитанная по соотношениям Герца зависимости высоты профиля АСМ-изображений частиц вируса табачной мозаики от величины нагружающей силы при сканировании.

с зондом взаимодействуют *несколько* атомов образца. Возникает вопрос о механизме АСМ-визуализации атомной структуры. Действительно, контакт с *единственным* атомом ($a \sim$ межатомного расстояния) может быть осуществлен лишь при минимизации силы воздействия зонда до величины $10 \div 100$ пН, что требует специальных экспериментальных условий¹⁶.

Известны наблюдаемые в ряде случаев особенности АСМ-визуализации атомной структуры поверхности: инверсия контраста, визуализация «ложного атома» на месте точечного дефекта. Ранее эти наблюдения объяснялись с позиции наличия на *кончике иглы* нескольких атомов, дающих одинаковый вклад во взаимодействие с образцом. Мы предлагаем подход, связывающий эти особенности с параметрами эксперимента, определяющими радиус контактной площадки a .

В силу *неоднородного распределения давления* в области контакта вклад каждого атома образца в силовое взаимодействие с зондом будет определяться его положением относительно центра области контакта. Формула контактной задачи Герца, описывающая распределение контактного давления, позволяет ввести аппаратную функцию АСМ¹⁷ вида:

$$A(x - x', y - y') \simeq \begin{cases} \sqrt{1 - \frac{(x - x')^2 + (y - y')^2}{a^2}} & \text{если } (x - x')^2 + (y - y')^2 \leq a^2 \\ 0 & \text{если } (x - x')^2 + (y - y')^2 > a^2, \end{cases} \quad (3)$$

где a — радиус области контакта. Введенная аппаратная функция связывает АСМ-изображение $f(x, y)$ с реальной геометрией атомной решетки поверх-

¹⁶например, проведения исследований в жидкости

¹⁷ее применимость ограничена случаем плоского образца и сферического кончика зонда

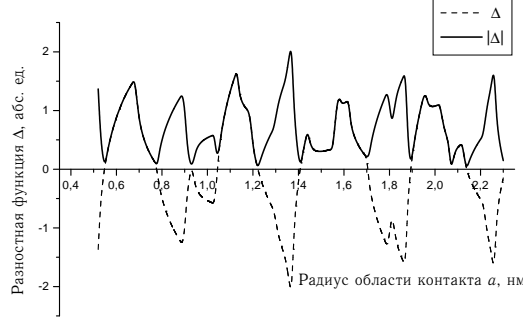


Рис. 2: Зависимость *разностной* функции АСМ-изображения (5) и ее модуля от радиуса области контакта a для модельного случая гексагональной решетки ($d = 0,52$ нм) с δ -функциями в качестве атомных.

ности исследования $\varphi(x, y)$:

$$f(x, y) = \iint A(x - x', y - y') \varphi(x', y') dx' dy' \quad (4)$$

Мы провели простейший анализ, вычисляя f по (4) для двух случаев: когда центр зонда находится *над атомом* и *между атомами* решетки. Поверхностную решетку образца описывали как гексагональную с параметром d , в качестве атомных функций выбирали δ -функции. Используя (3) и (4), обозначая для двух случаев вычисляемые функции как f_1 и f_2 и определяя *разностную* функцию АСМ-изображения:

$$\Delta = (f_1 - f_2), \quad (5)$$

рассчитали ее зависимость от a для $d = 0,52$ нм (параметр решетки слюды), см. рис. 2. Как следует из рисунка, значения *разностной* функции существенно варьируются в зависимости от параметра a . Более того, при различных значениях a может изменяться знак Δ , что должно приводить к наблюдению инвертированного АСМ-изображения (инверсия контраста). Особо следует подчеркнуть, что *не наблюдается* тенденция к уменьшению значений максимумов разностной функции по мере увеличения области контакта и, следовательно, вовлечения в контакт все большего количества атомов; т.е. сохраняется возможность получения «атомного» разрешения.

Для сравнения с экспериментом проводили измерения зависимости от радиуса области контакта спектральной плотности сечения функции $F(x, y)$ АСМ-изображения поверхности слюды вдоль основной оси решетки на пространственной частоте $k \sim 1/0,52 \text{ нм}^{-1}$, см. графики рис. 3. Измеряемая

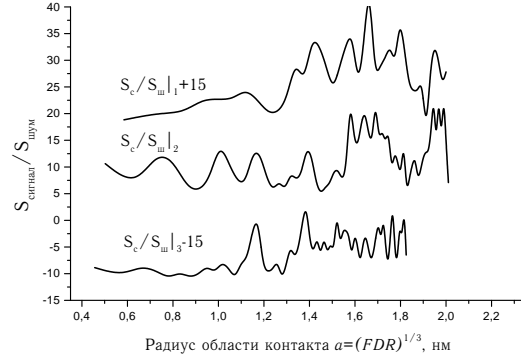


Рис. 3: Зависимость спектральной плотности сечения функции АСМ-изображения слюды на пространственной частоте $k \sim 1/0,52 \text{ нм}^{-1}$ вдоль основной оси решетки от радиуса области контакта a . Измеренная величина нормирована на спектральную плотность шума на той же частоте. Зависимости получены для трех различных зондов.

величина по своему физическому смыслу должна коррелировать с введенной выше *разностной* функцией (ее модулем, рис. 2). Эксперимент показывает, что при увеличении радиуса области контакта и увеличении числа контактирующих с зондом атомов образца действительно сохраняется возможность визуализации двумерной периодической структуры.

Однако, согласно проведенному анализу, визуализируемая «атомная» структура¹⁸ не является «истинной»¹⁹: структура элементарной ячейки на АСМ-изображении может отображаться неадекватно (инверсия контраста); влияние точечного дефекта перераспределяется по области размера $\sim a$. Отличие предлагаемого механизма визуализации атомной структуры в АСМ от описанных в литературе состоит в том, что он позволяет связать особенности (контраст, качество) АСМ-изображения атомной структуры с реальными параметрами эксперимента (силой воздействия зонда, модулями упругости зонда и образца, радиусом кривизны иглы и степенью ее асимметрии), а не с абстрактным «количеством атомов на кончике иглы».

¹⁸с теми же параметрами решетки, что и исследуемая поверхность

¹⁹при типичных условиях АСМ-эксперимента на воздухе

Восстановление истинной геометрии объектов по АСМ-изображению (учет эффекта уширения)

Эффект уширения проявляется в том, что у АСМ-изображений одиночных объектов²⁰ завышены значения ширины профиля, и связан с тем, что зонд микроскопа имеет конечный радиус кривизны кончика. Традиционно для учета эффекта уширения объект исследования описывают *сферической* геометрией. Мы обобщили этот подход для модели *эллипсоидального* объекта (в сечении — эллипс с полуосями a и b), что представляется существенным в свете изложенных выше результатов о контактных деформациях образцов под действием зонда.

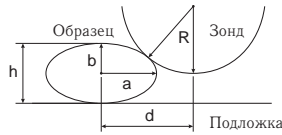


Рис. 4: Геометрия контакта зонда и образца (к объяснению эффекта уширения)

Была рассмотрена геометрическая модель (рис. 4), учитывающая взаимодействие объекта только с кончиком зонда («низкий» объект). Кончик зонда аппроксимировали либо полусферой радиуса R , либо параболоидом вращения ($z = kp^2$, где k — коэффициент параболы), при этом было показано, что результаты применения двух методик фактически тождественны²¹. Ставили задачу: по заданным значениям высоты АСМ-профиля ($2b$), параметра геометрии иглы (R или k) и ширины профиля АСМ-изображения на полувывоте ($2d$) определить истинное значение ширины объекта $2a$. Анализ геометрии контакта позволил в обоих случаях свести задачу к одному уравнению с одним неизвестным, для которого был создан алгоритм численного решения. Причем показали, что полученное уравнение *не имеет решения* в случае, когда выполняется условие (для модели параболической иглы):

$$k < b/d^2 \quad (6)$$

(сходное соотношение было получено и в модели сферической иглы). Смысл данных ограничений очевиден: если измеренные АСМ-профили объектов «острые», то и игла, с помощью которой они были прописаны, также должна быть достаточно «острой».

²⁰адсорбированных на поверхность подложки

²¹количественная разница найденных решений составляет <10%

Как показывает анализ устойчивости решения, определяющий вклад в погрешность a вносит погрешность параметра d ; типичные значения стандартного отклонения для найденных значений a могут превышать 20%, поэтому для уменьшения ошибки необходим набор достаточной статистики.

3 АСМ-исследования взаимодействия вирусной РНК с белками

²² Выбор объекта исследования объясняется следующим. Вирусы являются простейшими природными объектами, способными к репликации, и состоят из носителя генетической информации (молекулы нуклеиновой кислоты) и белковой оболочки. Процесс репликации регулируется спецификой взаимодействия молекулы нуклеиновой кислоты с белками. Наблюдение свободной РНК позволяет исследовать это взаимодействие, что может дать вклад в понимание механизмов процесса сборки вирусов, структурной организации и функционирования рибонуклеопротеидов.

В настоящее время разработан ряд методик фиксации макромолекул ДНК на поверхностях подложек для АСМ-исследований. Однако в литературе отсутствовали работы, посвященные подобным экспериментам с высокомолекулярной *однонитевой* РНК, что объясняется проблемой ее фиксации на подложке в расправленном состоянии. В работе апробировали методику приготовления вирусной РНК для АСМ-исследования и провели визуализацию стадий процесса последовательного высвобождения РНК из белковой оболочки частиц вируса табачной мозаики под действием химических реагентов. Следует отметить, что разработанная методика не включает какого-либо дополнительного контрастирования молекул РНК, в отличие от препарирования нуклеиновых кислот для электронной микроскопии (ЭМ).

Цельные частицы ВТМ были исследованы в режимах постоянного и прерывистого контактов на поверхностях пирографита и слюды (рис. 5). Было обнаружено, что скорость сорбирования вирусных частиц на подложку тем выше, чем больше степень гидрофобности ее поверхности; мы связываем это наблюдение с проявлением *гидрофобного* эффекта.

В мягких условиях депротенизации наблюдали рибонуклеопротеиды (РНП) с выходящими из них (с одного конца или с обоих) нитями РНК,

²²Результаты, изложенные в данной главе, получены в ходе совместной работы с научной группой д. х. н. Ю. Ф. Дрыгина (НИИ ФХБ им. А. Н. Белозерского МГУ)

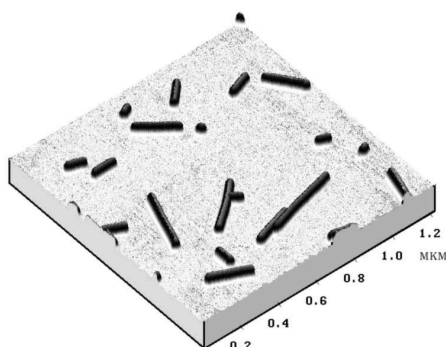


Рис. 5: Частицы вируса табачной мозаики, адсорбированные на пирографит; АСМ-исследование

см. рис. 6а. Протестировав три известные методики частичной депротеинизации ВТМ и высвобождения РНК, описанные в литературе, обнаружили, что наиболее перспективным является метод с применением диметилсульфоксида (ДМСО). Метод депротеинизации в растворах со щелочным значением pH характеризуется большим фоном получаемых АСМ-изображений. Кроме того, молекулы РНК в этом случае склонны к агрегации и в значительной степени сохраняют элементы вторичной структуры. Метод с использованием мочевины позволяет получать АСМ-изображения с незначительным фоном, но при этом наблюдается агрегация вирусных РНП.

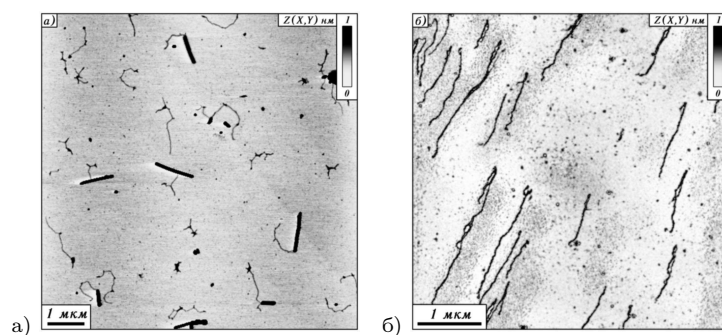


Рис. 6: а) Частично разрушенные рибонуклеопротеиды ВТМ, наблюдаются выходящие из концов частиц нити РНК; б) полностью высвобожденные молекулы РНК; АСМ-исследование, подложка — слюда

В жестких условиях депротеинизации белковая оболочка разрушается, и макромолекула РНК полностью высвобождается (рис. 6б). Изображенные здесь молекулы отделены от молекул разрушенной белковой оболочки методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и адсорбированы на

свежий скол слюды из 36% ДМСО в присутствии 1% ВАС (бензилалкиламмоний хлорида). Присутствие ДМСО способствует расправлению молекул, а ВАС — иммобилизации их на подложке.

Проводя анализ вирусных частиц, находящихся на промежуточной стадии разрушения, обнаружили, что в 40% случаев у вирусной частицы наблюдается две выходящих из остова нити частично высвобожденной РНК (в остальных случаях — одна нить). Статистический анализ зависимости длины обеих нитей от длины вирусного остова позволил зафиксировать *асимметрию* процесса высвобождения РНК из белковой оболочки для двух концов частицы, т.о. нами подтверждена полярность²³ разрушения вирусных частиц табачной мозаики.

4 Зондовая микроскопия процессов конденсации ДНК

²⁴ В живой природе (внутри вирусов и клеток) молекула ДНК находится в существенно «компактизованном» состоянии, занимая объем на несколько порядков (до 10^6) меньший, чем в растворе²⁵. В лабораторных условиях при помощи ряда конденсирующих агентов может быть осуществлена т.н. ψ -компактизация²⁶ ДНК (переход клубок \rightarrow глобула); известно, что двумя основными формами ψ -компактизованной молекулы являются *тороидальная* и *стержневая*. Применение метода АСМ для исследований компактизации молекул ДНК представляется весьма перспективным, поскольку оказывается возможным проводить исследования в нативных или близких к ним условиях, при этом можно определять не только форму, но и размеры исследуемых структур.

²³ впервые обнаружена по данным ЭМ

²⁴ Результаты, изложенные в данной главе, получены в ходе совместной работы с к. х. н. О. А. Пышкиной и к. х. н. В. Г. Сергеевым (Химический факультет МГУ)

²⁵ в *хорошем* растворителе

²⁶ от ψ — *psi* — *polymer and salt induced*

Определение геометрии комплексов ДНК-ПАВ, перешедших через границу раздела фаз вода/хлороформ

Компактизация ДНК при взаимодействии с катионными ПАВ и прохождение комплексов ДНК-ПАВ через межфазную границу вода/малополярный органический растворитель может рассматриваться как модель транспорта генетической информации в клетку. Представлялось интересным исследовать морфологию комплексов, перешедших из воды в хлороформ, и оценить количество молекул ДНК, входящих в комплекс, восстановив (по методике учета эффекта уширения, стр. 11) истинную геометрию объектов.

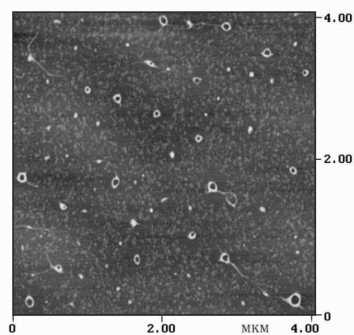


Рис. 7: Тороидальные комплексы ДНК-ПАВ, перешедшие в хлороформ из водной фазы, и адсорбированные для АСМ исследования на поверхность слюды

На рис. 7 приведены результаты АСМ-визуализации комплексов ДНК-ПАВ, перешедших в хлороформ: формой комплекса является тор. С целью анализа геометрии комплексов измеряли параметры: D — диаметр тора, d — диаметр сечения тора, h — высота тороидальной структуры над подложкой, и определили их средние значения²⁷: $D = 100 \pm 30$ нм, $d = 25 \pm 9$ нм и $h = 5 \pm 2$ нм. Для статистики пар значений d и h тестировали выполнение условия (6) и определяли предельное значение параметра геометрии иглы (R или k), при котором появляются случаи отсутствия решения. Так определили, что верхняя граница значения R , характеризующего конкретный зонд, составляет 12 нм (т.о. путем анализа АСМ-изображений объектов получена информация и о параметрах зонда). Было рассчитано, что если радиус зонда составляет $6 \div 12$ нм (нижняя граница получена из анализа тест-объектов), то среднее значение истинной ширины сечения тора a составляет $10 \div 11$ нм (т.о., формой комплекса ДНК-ПАВ является сплюс-

²⁷в качестве погрешности указаны стандартные отклонения, $N = 180$

нутый тор). Это позволило определить, что в состав 80% комплексов входит от 2 до 16 молекул ДНК.

Исследование изменений конформации ДНК в водно-спиртовых средах

Ранее сообщалось о результатах исследований флуоресцентной микроскопии (ФМ) динамики перехода клубок \rightarrow глобула для гигантской ДНК Т4 в водно-спиртовой смеси при вариации концентрации спирта (этанол, изопропанол) в присутствии катионов Na^+ . При этом структуру частично компактизованных образований и геометрию компактной глобулы определить не удавалось в силу ограничения разрешающей способности метода ФМ²⁸. Представлялось достаточно показательным применить метод СЗМ для исследования той же системы: визуализировать процесс в реальном масштабе времени *непосредственно в водно-спиртовой среде* (в *жидкостной ячейке* АСМ).

Препарат, содержащий молекулы ДНК Т4 в водно-спиртовой смеси при 80% концентрации изопропанола, вводили в жидкостную ячейку. При этих условиях макромолекулы ДНК осаждались на поверхность слюды в виде компактных глобул (рис. 8а). Применение методики учета эффекта уширения (стр. 11) позволило сделать вывод, что истинной геометрической формой глобулы является сплюснутый и слегка вытянутый эллипсоид, причем каждая глобула образована одной молекулой ДНК, находящейся в достаточно плотно упакованном состоянии.

При понижении концентрации спирта в ячейке с 80% до 40% наблюдали частичную декомпактизацию глобулярных структур, см. рис. 8б. Однако оказалось, что дальнейший процесс разворачивания глобул не происходит, что можно объяснить влиянием подложки. Поэтому макромолекулы ДНК в промежуточном состоянии (между глобулой и клубком) получали следующим образом. В жидкостную ячейку вводили молекулы ДНК, находящиеся в 40% изопропанол²⁹, а затем повышали концентрацию спирта в ячейке, при этом молекулы выпадали на поверхность подложки в частично компактизованном состоянии, рис. 9. Было обнаружено, что начальным процессом компактизации ДНК является закручивание отдельных участков макромолекулы в тороидальные структуры, которые, по-видимому, и являются цен-

²⁸определяется пределом разрешения оптического микроскопа

²⁹переход клубок \rightarrow глобула происходит при концентрации изопропанола более 50%

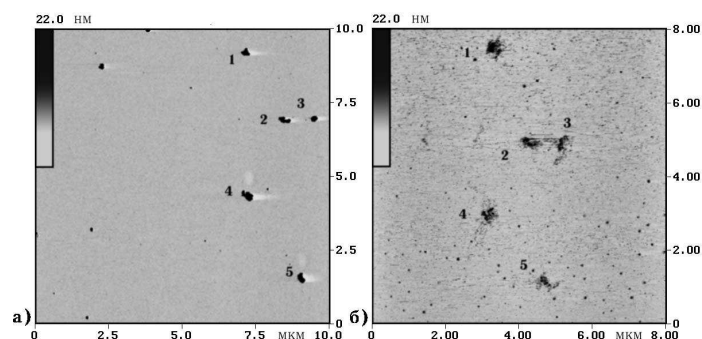


Рис. 8: Динамика процессов компактизации/декомпактизации молекул ДНК в водно-спиртовой среде; а) — компактные глобулы, выпавшие на поверхность слюды из 80% водного раствора изопропанола: б) — частично декомпактизованные глобулы (тот же участок поверхности) после понижения концентрации спирта до 40%; АСМ-исследование в жидкостной ячейке

трами дальнейшей компактизации, приводящей к формированию плотных глобул, визуализированных на рис. 8а.

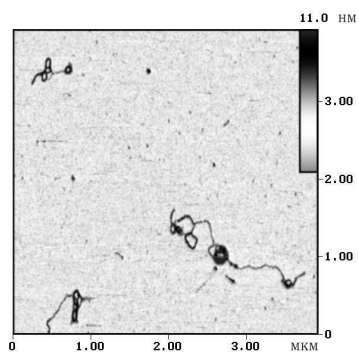


Рис. 9: Частично компактизованные молекулы ДНК, выпавшие на поверхность слюды из 40–50% водного раствора изопропанола; АСМ-исследование в жидкостной ячейке

5 Применение метода АСМ для анализа структуры тонких органических пленок

³⁰ Метод Ленгмюра-Блоджетт формирования органических покрытий состоит в перенесении плотноупакованных монослоев амфифильных молекул с границы фаз жидкость/газ на твердую подложку. Перенос обычно осуществляют вертикальным способом, мы использовали также метод горизонтального осаждения монослоев (при параллельности пленки и подложки). Технология ЛБ позволяет достаточно просто изменять свойства поверхности и формировать качественные пленочные покрытия с заданной структурой, что объясняет интерес к потенциальному использованию пленок ЛБ в высокотехнологичных отраслях. Однако для их широкомасштабного применения необходимо прояснить основные механизмы, определяющие структуру сформированных покрытий, и здесь новая информация может быть получена АСМ.

Мы обнаружили, что во многих случаях метод ГО³¹ позволяет формировать более качественные покрытия, чем вертикальный метод ЛБ, что может объясняться отсутствием искажающего влияния переориентации молекул в процессе переноса в этом случае (монослой переносится на подложку «как есть», в большей степени сохраняя свою структуру). Так, при АСМ-исследовании монослойных пленок бегеновой кислоты, сформированных на слюде методом ГО с водной субфазы, удалось визуализировать сосуществование двух областей, отличающихся высотой монослоя (разница 0,3–0,6 нм), см. рис. 10. Мы полагаем, что области разной высоты относятся к участкам различного двумерного фазового состояния пленки («твердая» и «жидко-конденсированная» фазы) с различной ориентацией молекул. При использовании традиционного вертикального метода ЛБ выделения монослоя визуализировать такие особенности структуры не удавалось.

Формирование кристаллитов в мономолекулярных пленках бегеновой кислоты и динамика процессов их разрушения/восстановления.

Мы обнаружили, что мономолекулярная пленка бегеновой кислоты, горизонтально осажденная на поверхность подложки (как слюды, так и пирографита) с субфазы, содержащей тиол-стабилизированные полупроводни-

³⁰Результаты, изложенные в данной главе, получены в ходе совместной работы с к. х. н. Г. К. Жавнерко (ИФОХ АН Беларуси, Минск)

³¹ГО — горизонтального осаждения

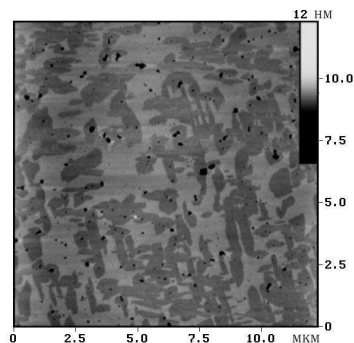


Рис. 10: Монослой бегеновой кислоты, приготовленный горизонтальным методом осаждения на слюду.

Визуализированы участки различного фазового состояния молекул пленки, характеризующиеся различной высотой монослоя. Наряду с этим в пленке наблюдаются поры глубиной до подложки (интенсивно темные области). АСМ-исследование

ковые CdTe кластеры³², содержит ламелярные кристаллические включения (рис. 11а). Было показано, что их формирование имеет место лишь при наличии в субфазе CdTe кластеров.

Однако доказать методом АСМ присутствие кластеров в сформированном покрытии не удалось. Тем не менее, представлялось интересным исследовать структурные особенности кристаллитов. Было установлено, что ламели ориентированы не произвольным образом, а вдоль некоторых *выделенных* направлений решетки подложки. Так, углы между ламелями кратны 60° , как при использовании подложки из слюды, так и графита. Оказалось, что на подложке из слюды ламели ориентированы к основным осям решетки подложки под углом, близким 20° , а на пирографитовой подложке — близким 30° . При этом вектор \vec{a} молекулярной решетки поверхности кристаллитов (ЦП³³-тип, см. ниже) ориентирован по направлению ламели.

Было обнаружено, что эти кристаллические образования разрушаются при увеличении воздействующей силы зонда (до 100 нН). После нескольких сканирований с увеличенной силой воздействия кристаллиты «исчезают» с АСМ-изображения (при этом окружающий их монослой остается), см. рис. 11б. Мы считаем, что резервуаром для удаленного материала кристаллитов является боковая поверхность зонда. Если после разрушения кристаллитов продолжать сканирование, минимизировав силу воздействия зонда, то через несколько последовательных сканирований кристаллические структуры частично восстанавливаются в тех участках поверхности, где были прежде, см. рис. 11в. При этом восстанавливается и их высота, что

³²Cd₅₄Te₃₂(SCH₂CH₂OH)_{x≈50} — перспективный объект опто- и наноэлектроники

³³ЦП — центрированная прямоугольная

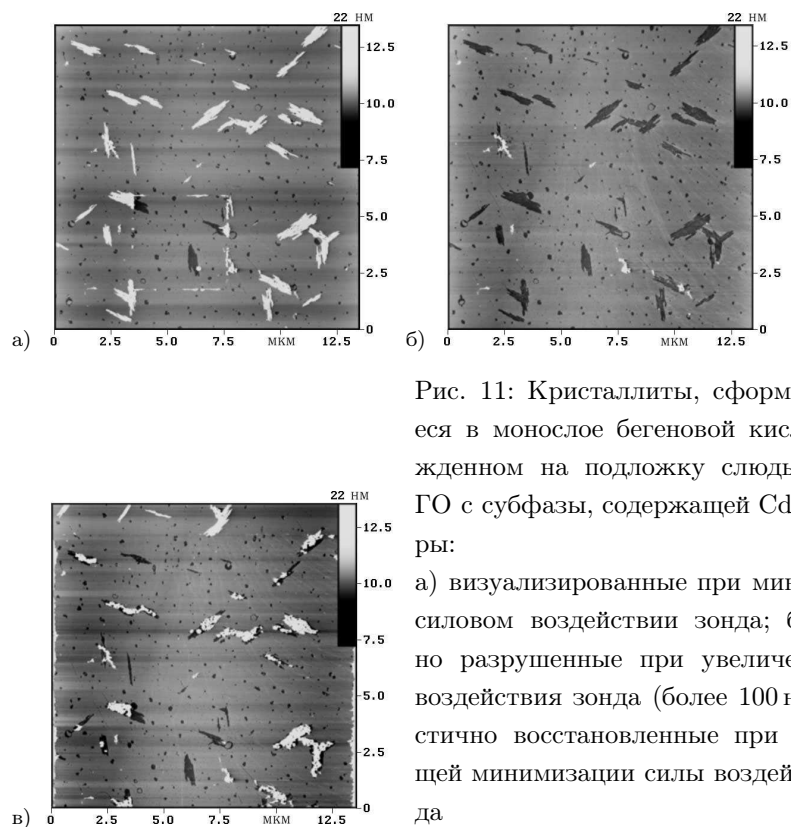


Рис. 11: Кристаллиты, сформировавшиеся в монослое бегеновой кислоты, осажденном на подложку слюды методом ГО с субфазы, содержащей CdTe кластеры:

а) визуализированные при минимальном силовом воздействии зонда; б) частично разрушенные при увеличении силы воздействия зонда (более 100 нН); в) частично восстановленные при последующей минимизации силы воздействия зонда

свидетельствует о значительной механической стабильности этих образований.

Исследование молекулярной упаковки тонких органических пленок

Метод АСМ представляется весьма перспективным для исследования структуры молекулярной упаковки тонких органических пленок. Основным препятствием подобных исследований является неустойчивость пленок к локальному воздействию зонда при сканировании участков малой площади, что часто приводит к локальному разрушению покрытий. Тем не менее, для ряда пленок оказалось возможным с помощью АСМ достичь молекулярного разрешения и определить параметры элементарной ячейки. Основным фактором, ограничивающим точность подобных АСМ-измерений, является *температурный дрейф*, поэтому для исключения его искажающего

влияния параметры молекулярной упаковки определяли путем усреднения результатов измерений значительного числа АСМ-изображений, полученных при разной ориентации держателя лезера и образца и при различном направлении сканирования. Ниже приведены значения средних арифметических для измеряемых параметров, в качестве погрешности приведены величины *стандартного отклонения*³⁴; точность калибровки прибора мы оцениваем на уровне 2%.

Бегеновая кислота. Структурная формула: $C_{21}H_{43}COOH$.

№	подложка	a , нм	b , нм	N
1	слюда	$0,48 \pm 0,03$	$0,77 \pm 0,06$	60
2	графит	$0,50 \pm 0,02$	$0,78 \pm 0,06$	70
3	слюда	$0,47 \pm 0,02$	$0,88 \pm 0,08$	70
4	слюда	$0,53 \pm 0,03$	$0,77 \pm 0,04$	10

Таблица 1: Параметры двумерной решетки молекулярной упаковки тонких пленок бегеновой кислоты (ЦП-ячейка).

№1 и №2 — для поверхности кристаллитов (см. выше); №3 — для монослоя, перенесенного вертикальным методом ЛБ на слюду, №4 — для монослоя, горизонтально осажденного на слюду.

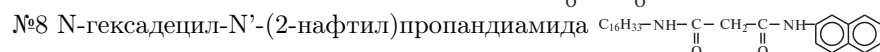
Значения параметров молекулярной упаковки поверхности *кристаллитов* (№1 и №2 таблицы 1), сформированных в монослоях бегеновой кислоты на субфазе, содержащей CdTe кластеры (см. выше), близки значениям $a = 0,496$ и $b = 0,785$ нм, определенным Китайгородским³⁵ из принципа плотной упаковки углеводородных цепей для слоев молекул с R-подъязычкой. Мы обнаружили, что близкими значениями характеризуется также молекулярная упаковка монослоя пчелиного воска на поверхности пирографита (инертная подложка). Можно предположить, что в этих случаях влияние подложки на молекулярную структуру минимально. В то же время для *монослоев* бегеновой кислоты на *слюде* (№3 и №4 таблицы 1) параметры решетки отличаются от значений, определяемых принципом плотной упаковки углеводородных цепей, что может объясняться влиянием подложки. При использовании подложки *пирографита* молекулярного разрешения достичь не удастся. АСМ визуализирует иной тип структуры: материал пленки организуется в периодические образования (период $6,3 \pm 0,4$ нм)

³⁴ниже N — число измеренных АСМ-изображений

³⁵См., например, А. Н. Китайгородский. *Молекулярные кристаллы*. — М.: Наука, 1971 г.

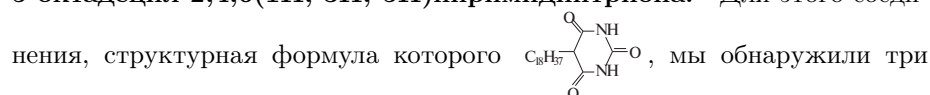
с углом взаимориентации 60° и углом к осям решетки подложки 30° ; мы полагаем, что эти структуры являются полуцилиндрическими мицеллами.

Пленки кетоамидов. Было получено молекулярное разрешение для перенесенных методом ГО на слюду монослойных пленок соединений:



³⁶ Было обнаружено, что за одним исключением³⁷ АСМ-изображения пленок исследованных соединений (№5–7 и №9) характеризуются гексагональной решеткой с параметром ячейки, весьма близким³⁸ значению 0,48 нм, которое характеризует упаковку слоев углеводородных цепей с Н-подъёмкой (т.н. «газокристаллическая» фаза³⁹). Молекулы соединений №5 и №7 имеют по два углеводородных фрагмента равной длины, и можно предположить, что каждой молекуле на АСМ-изображении соответствуют две пучности. Однако наблюдение гексагональной упаковки углеводородных цепей, попарно объединенных в молекулы, несколько неожиданно, поскольку для объяснения высокой симметрии «газокристаллической» фазы допускают, что углеводородные цепи сохраняют возможность независимого ротационного движения вокруг своей оси.

Сосуществование различных типов упаковок в структуре пленок 5-октадецил-2,4,6(1Н, 3Н, 5Н)пиримидинтриона. Для этого соеди-



различных типа упаковки (таблица 2) для участков различной структуры пленки (рис. 5а): монослоя, островковых образований и кристаллитов, спонтанно формирующихся в монослойном покрытии, переносимом методом ГО на слюду. Молекулярная упаковка островковых и кристаллических

³⁶ молекулы соединений №5–7 переорганизовывались в трехслойные образования, пленки №8, №9 сохраняли монослойную структуру

³⁷ №8, для которого параметры решетки: $a = 0,566 \pm 0,015$, $b = 0,80 \pm 0,03$ нм

³⁸ различие менее 1%

³⁹ другое название — «ротационно-кристаллическая» фаза

№, тип	подложка	a , нм	b , нм	N
10	слода	$0,548 \pm 0,009$	$1,56 \pm 0,08$	20
11	слода	$0,549 \pm 0,009$	$1,31 \pm 0,06$	110
12	слода	$0,508 \pm 0,007$	$1,37 \pm 0,08$	40

Таблица 2: Параметры двумерной решетки молекулярной упаковки тонких пленок 5-октадецил-2,4,6(1Н, 3Н, 5Н)пиримидинтриона (ЦП-ячейка).

№10 — для монослоя, №11 — для кристаллитов (3, 6 и 9 слоев), №12 — для островковых образований (2 слоя)

образований характеризовалась ЦП-ячейкой с отличающимися параметрами a и b , но близкими значениями площади, приходящейся на молекулу ($0,35 \text{ нм}^2$ и $0,36 \text{ нм}^2$), см. таблицу 2. В то же время АСМ-изображение молекулярной упаковки монослоя характеризовалось, во-первых, сверхструктурой (рис. 5б), а во-вторых, большей площадью на молекулу. Это может объясняться влиянием подложки, поскольку направление вектора \vec{b} в этом случае совпадает с одной из кристаллографических осей слюды, причем параметр $b = 1,56 \text{ нм}$ соизмерим с параметром решетки подложки — $0,52 \text{ нм}$ (при этом параметр a имеет то же значение, что и для кристаллитов).

Рис. 12: Структура тонких пленок 5-октадецил-2,4,6(1Н, 3Н, 5Н)пиримидинтриона, АСМ-исследование.



Т.о., мы показали, что параметры молекулярной структуры пленок определяются несколькими конкурирующими факторами: принципом плотной упаковки углеводородных цепей, значением площади полярной группы и влиянием подложки.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны модели и построены алгоритмы учета двух основных *артефактов* АСМ: эффектов *уширения* и *занижения высоты* профиля одиночных объектов, адсорбированных на поверхность твердой подложки. Предложена методика определения упругих параметров отдельного микрообъекта. С позиции теории контактных деформаций проанализирован механизм АСМ-визуализации атомной структуры поверхности.
2. Апробирована методика иммобилизации на поверхности подложки свободных молекул одонитовой вирусной РНК в расплавленном состоянии. Методом АСМ визуализированы стадии процесса высвобождения РНК из белковой оболочки частиц вируса табачной мозаики и подтверждена асимметрия протекания этого процесса относительно двух концов молекулы.
3. Методом АСМ исследована динамика процесса компактизации молекулы ДНК Т4 в водно-спиртовых средах, визуализированы молекулы, находящиеся на различной стадии компактизации. Обнаружено, что частично компактизованные структуры включают тороидальные участки, образованные отдельными витками молекулы. По результатам измерений АСМ восстановлена реальная геометрия компактных структур и рассчитан их молекулярный состав.
4. По результатам АСМ-исследований структуры ЛБ пленок показана перспективность метода горизонтального осаждения монослоев на подложку. Для ряда тонкопленочных покрытий получено молекулярное разрешение и определены параметры решетки с погрешностью в единицы процентов. Показано, что структура пленки определяется совокупностью факторов: принципом плотной упаковки углеводородных цепей, значением площади полярной группы на поверхности субфазы и влиянием подложки.

Список публикаций по теме диссертации

1. V. Yu. Uvarov, Yu. D. Ivanov, A. N. Romanov, M. O. Gallyamov, O. I. Kiselyova, I. V. Yaminsky. Scanning tunneling microscopy study of cytochrome P-450 2B4 incorporated in proteoliposomes // Biochimie. — 1996. — V. 78. — P. 780–784.

2. V. G. Sergeyev, O. A. Pyshkina, M. O. Gallyamov, I. V. Yaminsky, A. B. Zevin, V. A. Kabanov. DNA-surfactant complexes in organic media // *Progr Colloid Polym Sci.* — 1997. — V. 106. — P. 198–203.
3. М. О. Галлямов, И. В. Яминский. Нуклеиновые кислоты // Учебное пособие «Сканирующая зондовая микроскопия биополимеров» / под ред. д.ф.-м.н. И.В. Яминского. — М.: Научный мир, 1997. — С. 25–40.
4. М. О. Галлямов, О. А. Пышкина, В. Г. Сергеев, И. В. Яминский. Применение методов сканирующей зондовой микроскопии к исследованию конформационных свойств ДНК // *Поверхность; РСНИ.* — 1998. — № 2. — С. 79–83.
5. С. А. Бычихин, М. О. Галлямов, В. В. Потемкин, А. В. Степанов, И. В. Яминский. Сканирующий туннельный микроскоп — измерительное средство нанoeлектроники // *Измерительная техника.* — 1998. — № 4. — С. 58–61.
6. Yu. F. Drygin, O. A. Bordunova, M. O. Gallyamov, I. V. Yaminsky. Atomic force microscopy examination of TMV and virion RNA // *FEBS letters.* — 1998. — V. 425. — P. 217–221.
7. G. K. Zhavnerko, V. E. Agabekov, M. O. Gallyamov, I. V. Yaminsky, I. V. Lokot, F. A. Lachvich. AFM study of morphological peculiarities of Langmuir-Blodgett films from amphiphilic derivatives of 4-hydroxy-6-methyl-2-pyrone // *Conference proceedings of third Belarussian seminar on scanning probe microscopy.* — Grodno, Oktober 1998. — P. 91–93.
8. М. О. Галлямов, О. А. Пышкина, В. Г. Сергеев, И. В. Яминский. Структура поликомплексов в водных и органических средах // *Материалы всероссийского рабочего совещания «Зондовая микроскопия-99».* — Н. Новгород, март 1999. — С. 230–236.
9. М. О. Галлямов, И. В. Яминский. Количественные методики восстановления истинных топографических свойств объектов по измеренным АСМ-изображениям: 1. Контактные деформации зонда и образца; 2. Учет эффекта уширения АСМ-профиля // *Материалы всероссийского рабочего совещания «Зондовая микроскопия-99».* — Н. Новгород, март 1999. — С. 357–364; — С. 365–371
10. М. О. Галлямов, Ю. Ф. Дрыгин, И. В. Яминский. Визуализация РНК и рибонуклеопротеидов вируса табачной мозаики методами атомно-

силовой микроскопии // Поверхность; РСНИ. — 1999. — № 7. (в печати)

11. Г. К. Жавнерко, Т. А. Кучук, В. Е. Агабеков, М. О. Галлямов, И. В. Яминский.
Свойства и структура мономолекулярных пленок на основе N-октадецил-3,4:9,10-периленис(дикарбосидиимида) // Журнал физической химии. — 1999. — № 7. (в печати)
12. А. С. Андреева, М. О. Галлямов, О. А. Пыпкина, В. Г. Сергеев, И. В. Яминский.
Морфология комплексов ДНК-ПАВ, перешедших через границу раздела фаз вода-хлороформ, по результатам атомно-силовой микроскопии // Журнал физической химии. — 1999. — № 9. (в печати).

см. также раздел «Апробация работы».